重组猪胰蛋白酶及其 R122 位点突变体在毕赤酵母中的高效表达及其性质研究

张潘潘[1] 许延吉[1] 王之可[2] 刘晓[2] 李素霞[1*]

（1. 华东理工大学生物反应器工程重点实验室，上海 200237；

2. 上海雅心生物技术有限公司，上海 201108）

摘要 目的：研究 R122 位点突变重组猪胰蛋白酶，与野生型酶相比较，该位点对重组猪胰蛋白酶（RPT）性质的影响。方法：以毕赤酵母 GS115 作为表达宿主，对 RPT、突变体 mRPT(R122H)和 mRPT(R122H/R73G/R130T)进行表达及纯化。并对其性质和稳定进行对比研究。结果：重组胰蛋白酶及其突变体在毕赤酵母中均获得了高效表达。相对于 RPT，突变体 mRPT(R122H)和 mRPT(R122H/R73G/R130T)在以 N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯 （BAEE）为底物时，具有更强底物结合力，三者的米氏常数分别为 18.8μM， 8.5 μM 和 11.0 μM；两突变体耐高温耐碱能力增强；在 Ca^{2+}存在及去除的条件下，突变体具有更强的抗自降解能力。结论：可以利用毕赤酵母高效表达重组胰蛋白酶及其突变体。mRPT(R122H)和 mRPT(R122H/R73G/R130T) 相对于野生型 RPT，对高 pH 条件和高温的耐受性增强，该稳定性的提高主要归因于 R122 位点的突变。

关键词： 重组猪胰蛋白酶；毕赤酵母；突变体；mRPT(R122H)；mRPT(R122H/R73G/R130T)；性质；稳定性

中图分类号 Q786

High-level Expression and Characterization of Recombinant Porcine Trypsin and Its R122 Site Mutant in Pichia pastoris

ZHANG Pan-pan[1] XU Yan-ji[1] WANG Zhi-ke[2] LIU Xiao[2] LI Su-xia[1]*

(1 East China University of Science and Technology,State Key Laboratory of Bioreactor Engineering,Shanghai

200237,China)

(2 Shanghai Yaxin Biotehnology Co.,Ltd,Shanghai 201108,China)

Abstract Objective: Study the effect of R122 residue mutation on the stability of recombinant porcine trypsin (RPT). Methods: RPT,mutants mRPT(R122H) and mRPT(R122H/R73G/R130) were expressed in Pichia pastoris GS115 and further purified. The properties and stabilities of RPT and two mutants was investigated and compared. Results: RPT and its mutants were highly expressed in Pichia pastoris. Relative to RPT, mutant mRPT (R122H) and mRPT (R122H/R73G/R130T) showed higher affinity to substrate BAEE, The Km values were 18.8μM, 8.4μM and 10.5μM, respectively. Increased stability of mutants to high temperature and alkali were observed. And higher resistance against autolysis were got in the presence and without Ca^{2+}. Conclusion: Pichia pastoris can be used to efficiently express RPT and its mutants.Increased stability under alkaline condition and higher thermal stability and higher anti-self-digestion were got in mutant mRPT (R122H) and mRPT (R122H/R73G/R130T) compared to wild-type RPT, which contribute to the site mutation at the R122.

Key words: Recombinant porcine trypsin; Pichia pastoris; mutation; mRPT(R122H); mRPT(R122H/R73G/R130T); property; stability

作者简介：张潘潘（1990-），男，江西抚州，硕士生，研究方向为应用酶学。

E-mail：panpanzhangz@163.com

*通信作者：李素霞，E-mail：lisuxia@ecust.edu.cn

前言

胰蛋白酶（EC 3.4.21.4）作为丝氨酸蛋白酶，是一种非常重要的蛋白质消化酶，广泛运用于皮革处理、食品加工、医药、临床诊断等领域[1]，现在，胰蛋白酶主要是从动物胰液中提取，而这种传统提取生产工艺生产的产品具有携带病原体或病毒污染的可能，限制了胰蛋白酶在制药行业运用[2-3]。同时提取产品中往往含有其他蛋白酶，并且野生型胰蛋白酶本身易发生自降解[4]，例如在蛋白组学分析中，先用胰蛋白酶消化目的蛋白降解成小肽段，然后由质谱进行肽段分析，在酶消化过程中，发现由于溶液环境等的影响，往往导致胰蛋白酶发生变性、失活和自降解，这种现象影响了胰蛋白酶的运用[5]。重组胰蛋白酶的研究和应用是解决以上问题的重要方法。

重组胰蛋白酶原在大肠杆菌和毕赤酵母表达体系中均有得到成功的报道[6-7]。胰蛋白酶能专一性识别水解精氨酸和赖氨酸羧基端肽键,导致胰蛋白易能发生自身识别切割而降解，不同来源的胰蛋白酶自降解位点有所差异[8]。近年来，对于胰蛋白酶的自降解和突变的研究有一些研究报道。如：牛胰蛋白酶的β-胰蛋白酶易在 R122-V123、K148-S149 和 K 162-A163 之间的肽键发生水解导致产生 3 种同工型α-胰蛋白酶，这些水解位点对胰蛋白酶的活性造成不同程度的影响[9]。人胰蛋白酶和牛胰蛋白酶的氨基酸序列具有高度的相似性，人体内胰蛋白酶在 R122 位突变成 H122 是遗传性胰腺炎的主要原因[10-11]。通过将人胰蛋白酶的该位点 R 突变成 L，不仅显著性提高了胰蛋白酶的稳定性、抗自降解能力，同时也增强了胰蛋白酶对底物 BAEE 的亲和力[12]。在鼠胰蛋白酶 K66、R122 位点引入 N，使得胰蛋白酶的自降解活性得到极大的抑制，突变未影响鼠胰蛋白酶的催化效率[13]。

本研究主要以猪胰蛋白酶为研究对象，通过三维结构模拟猪胰蛋白酶结构（图 1）。发现位点 R73，R122，R130 处于胰蛋白酶的分子表面，推测为胰蛋白酶自身识别而发生降解的位点。这一推测已由猪胰蛋白酶的自降解肽段分析实验得以证明（本文未列出）。因此，本文构建了野生型 RPT 及突变体 mRPT(R122H)和 mRPT(R122H/R73G/R130T)，通过对其催化动力学和稳定性的对比，以期得到提高重组猪胰蛋白酶抗自降解能力的突变体。

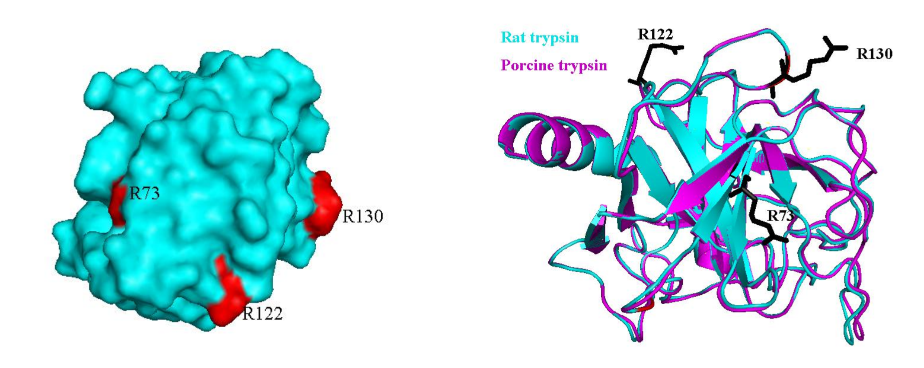


图 1 猪胰蛋白酶三维结构模型模拟。

PT 的 3D 表面结构模拟（图左），红色标记位点为突变位点（R73,R122,R130）。PT 和 RT 三维卡通模型比较（图右），黑色标记位点为突变位点（R73,R122,R130）。PT 和 RT 的 3D 结构来源 Protein Data BanK，3D 结构模拟由 PyMol Version 0.99 完成。

Fig 1 Three dimentional structure of porcine trypsin.

3D surface structure model of trypsin (left),and the mutation sites (R73,R122,R130) are marked as red.PT and RT 3D cartoon model comparison(right)，and the mutation sites (R73,R122,R130) of RPT are marked as black.The 3D structure of trypsin was obtained from the Protein Data Bank (PDB) and The 3D structure of trypsin was obtained using PyMol Version 0.99.

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株与试剂

pPIC-9K 质粒和毕赤酵母 GS115 菌株由实验室保存；基因合成及测序由上海捷瑞生物技术有限责任公司完成；胰蛋白胨(Tryptone)和酵母提取物(Yeast extract)为 OXIOD 公司产品；BAEE，购自 Sigma 公司；其它试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

紫外分光光度计（北京普析通用仪器有限责任公司），安捷伦液相分析仪 1260（安捷伦科技有限公司），C18(5 μm,4.6×250 mm,200 Å) (Sepax bio)，精密 pH 仪（FE20 梅特勒-托利多仪器公司），10 L 发酵罐（上海傲中生物工程设备有限公司）。

1.3 重组质粒的构建

猪胰蛋白酶原基因全长序列（Uniprot:P00761）按照毕赤酵母密码子优化合

成，通过 *EcoR* Ⅰ、*Not* Ⅰ酶切位点插入到 pPIC-9K 质粒上。R122H 和 R122H/R73G/R130G 两突变体通过定点突变技术构建，与野生型相同酶切位点插入到 pPIC-9K 质粒上。野生型和突变体基因序列经 PCR 和测序鉴定。引物设计如下：

含有 *EcoR* Ⅰ酶切位点的正向引物：

5’-CCG**GAATTC**GATGATGATGATAAGATTGTTGG-3’

与含有 *Not* Ⅰ酶切位点的反向引物：

5’-ATAGTTTA**GCGGCCGC**TTAACAGTTAGCAGCAATAG-3’。

1.4 表达菌株的构建

重组质粒由 *Sac I* 酶切线性化，切胶回收纯化后，电转转化到毕赤酵母 GS115 中，G418 抗性筛选得到高拷贝重组胰蛋白酶表达菌株。取-80 ℃保存菌株涂板至 YPD（1 %酵母提取物，2 %蛋白胨，2 %葡萄糖）培养基上活化，挑取单菌落转接至 100 mL BMGY（1 %酵母提取物，2 %蛋白胨，1.34 %YNB，100 mM 磷酸钾缓冲液 pH 6.0，1 %甘油)培养基，在 30 ℃ 250 rpm 条件下培养 24 h，离心收集菌体，重悬于 100 mL BMMY(1 %酵母提取物，2 %蛋白胨，1.34 %YNB，100 mM 磷酸钾缓冲液 pH 5.0 ，0.5 %甲醇)培养基中，在 30 ℃ 250 rpm 条件下，诱导 72 h，每 24 h 添加 0.5 %甲醇诱导胰蛋白酶表达。取培养液，电泳鉴定表达情况。

1.5 10 L 发酵罐分批补料发酵

取-80 ℃保存菌株划板至 YPD 平板(1 %酵母提取物，2 %蛋白胨，2 %葡萄糖，1.5 %琼脂粉)。挑取单菌落接种至 100 mL YPD 培养基中，在 30 ℃ 250 rpm 条件下培养 24 h，接种至含 6 L 基础培养基（85 % H_3PO_4 26.7 ml/L，$CaSO_4$ 0.93 g/L，K_2SO_4 18.2 g/L，$MgSO_4\cdot7H_2O$ 14.9 g/L，KOH 4.13 g/L，甘油 40 g/L)的 10 L 发酵罐，加入 PTM1 4 ml/L(PTM 1:$CuSO_4\cdot7H_2O$ 6 g/L，KI 0.08 g/L，$MnSO_4\cdot H_2O$ 3 g/L，$Na_2MoO_4\cdot2H_2O$ 0.2 g/L，H_3BO_3 0.02 g/L，$ZnSO_4\cdot7H_2O$ 20 g/L，$FeSO_4\cdot7H_2O$ 65 g/L，$CoCl_2\cdot6H_2O$ 0.5 g/L，Biotin 0.2 g/L，H_2SO_4 5 ml/L），pH 通过氨水控制在 5.5 左右，发酵温度维持 30℃，溶氧（DO）维持在 20 %到 30 %之间。当培养基中的甘油耗尽，DO 上升至 50 %以上时，开始补加甘油（50 % 甘油，12 mL/L

PTM 1）至培养至菌浓 OD_{600} 达到 250。流加甲醇诱导表达，直至发酵结束。

1.6 纯化

离心收集培养基上清，对 20 mM HAc-NaAc pH 4.5 缓冲液在 4℃透析。透析后样品上用同样缓冲液平衡好的 CM-FF 阳离子型交换柱，NaCl 梯度纯化，SDS-PAGE 鉴定收集液，根据电泳结果，收集目的蛋白样液，透析除盐，激活获得活性胰蛋白酶，之后经苯甲脒柱亲和纯化，获得重组胰蛋白酶，-20 ℃以下保存。

1.7 胰蛋白酶活性测定

胰蛋白酶的活性测定以 N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯（BAEE）底物。将底物溶解于缓冲液（100 mM 三羟甲基氨基甲烷（ Tris-HCl）缓冲液 pH 7.6，含 20 mM $CaCl_2$，0.25 mM BAEE），取光程为 1cm 的带盖石英比色杯，加入 25℃ 预热过的 3.0 mL 0.25 mM BAEE 底物溶液，在 253 nm 的波长处，立即调零。再加入适量待测酶液，立即盖上盖迅速混匀计时，每半分钟读数一次，共读 3～4 min。每 30 s 吸收度的改变应恒定在 0.015 ～0.018 之间，呈线性关系的时间不得少于 3 min。定义在上述条件下，底物吸光光度值每分钟△A253 变化 0.003 所需反应的酶量为一个 USP 酶活性单位，计算公式有（1）：

$$\text{胰蛋白酶活力单位（USP/mL）} = \frac{\Delta A_{253}/\text{min}}{0.003 \times \text{酶液加入体积}} \times \text{稀释倍数} \quad (1)$$

1.8 重组胰蛋白酶及其突变体的酶学性质

1.8.1 酶促反应动力学测定

配置 0.015~0.3 mM 不同浓度的 BAEE 测活底物。在最适条件下，加入适量的酶液进行测活，以 1/[S]为横坐标，1/V 为纵坐标，通过双倒数法作图求得 Km 值和 Vmax。

1.8.2 最适 pH 测定

配置 pH 3.0 至 pH 11.0 缓冲液体系，pH 3.0-5.0 为 NaAc-HAc 缓冲液，pH

6.0-8.0 为 Tris-HCl 缓冲液，pH 9.0-11.0 为 Gly-NaOH 缓冲液。以上述缓冲液分别配置 0.25 mM 的 BAEE 底物，取适量的酶液，在标准条件下，测定胰蛋白酶酶活，以最高酶活计为 100%。

1.8.3 pH 稳定性

取 RPT 和两突变体纯酶液分别溶解至如上配置的 pH 3.0 至 pH 11.0 缓冲液中，稀释成终浓度为 0.5 mg/mL，于 25℃水浴条件下温育 4 h，以温育前 0 h 酶液的初始酶活活力为 100 %计算酶活性残余率。

1.8.4 最适温度测定

将底物 BAEE 分别放置 25 ℃~60 ℃水浴温育 30 min，取适量酶加入反应体系测定胰蛋白酶活性，结果表示为 OD_{253} 随时间的变化曲线。

1.8.5 温度稳定性测定

取 RPT 和两突变体酶液稀释至 0.5 mg/ml，置于 4 ℃~60 ℃水浴温育，分别在温育 2 h、4 h、8 h、12 h、16 h 取样，按标准方法测活，以温育前 0 h 酶液的初始酶活活力为 100 %计算酶活性残余率。

1.8.6 Ca^{2+}对重组胰蛋白酶及其突变体的稳定性影响分析

取 RPT 和两突变体稀释至浓度 0.5 mg/mL，分别溶解到含 1 mM EDTA 或 25 mM Ca^{2+} 的 Tris-HCl pH 8.0 的缓冲液中，于 25 ℃水浴条件温育，不同时间点取样，按标准方法测活。以温育前 0 h 酶液的初始酶活活力为 100 %，计算酶活性残余率。

1.9 RP-HPLC 分析 RPT 及其突变体稳定性

取 RPT 及其两突变体分别溶解至含有 1 mM EDTA 的 100 mM Tris-HCl pH 8.0 缓冲液中，蛋白样液终浓度为 0.5 mg/mL。在 25 ℃的水浴中温育 1h，过滤后，进行 RP-HPLC 分析，检测方法根据 USP 分析方法。以 0h 的蛋白样液为对照组。

色谱条件：采用 C18 色谱柱（EF-C18（H）4.6×250 mm，3 μm220 Å），流动相 A 为 0.1 %磷酸水溶液，流动相 B 为含 0.1 %磷酸乙腈。流速 1.0 mL/min，检测波长 280 nm，柱温 40 ℃。梯度洗脱（0~25 min，A 75 %~55 %；25~30 min，A 55 %~10 %；30~34 min，A 10 %；34~35 min，A10 %~75 %；35~45 min，A 75 %）

2 实验结果

2.1 重组毕赤酵母的构建及表达鉴定

含野生型及其两突变体猪胰蛋白酶原基因的重组质粒由 *Sac I* 酶切线性化，经 0.8 %琼脂糖凝胶电泳鉴定结果见图 2，切胶回收纯化后，电转转到毕赤酵母 GS115 中，甲醇诱导表达，离心收集培养基上清，15 % SDS-PAGE 鉴定结果见图 3a。RPT 和两突变体表达均以酶原形式分泌表达至培养外液当中，三者的表观分子量约为 20.1 KDa，表明均正确表达。

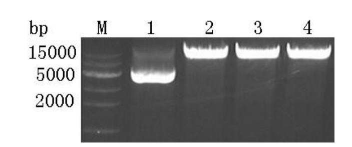


图 2 重组质粒的线性化

Fig 2 Electrophoresis of traget fragment identified by PCR

M:DNA mark; 1 Negative control(pPIC-9K-RPT); 2 pPIC-9K-RPT linearized by *Sac I*; 3 pPIC-9K-mRPT(R122H) linearized


by *Sac I*; 4 pPIC-9K-RPT linearized by *Sac I*

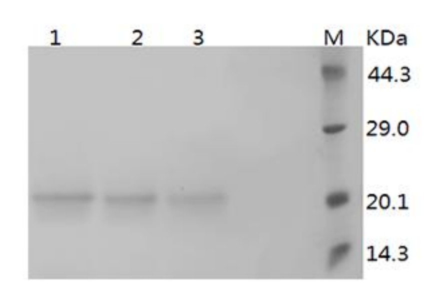


图 3 重组猪胰蛋白酶原及其突变体诱导表达酶原

Fig.3 SDS-PAGE analysis of expression of recombinant RPT and mutants and the activation of the recombinant trypsinogen

M:Protein marker; 1: recombinant porcine trypsinogen; 2 and 3, mutants mRPT(R122H) and mRPT(R122H/R73G/R130T)

2.2 重组猪胰蛋白酶及其突变体的制备

2.2.1 mRPT(R122H)突变体高密度发酵

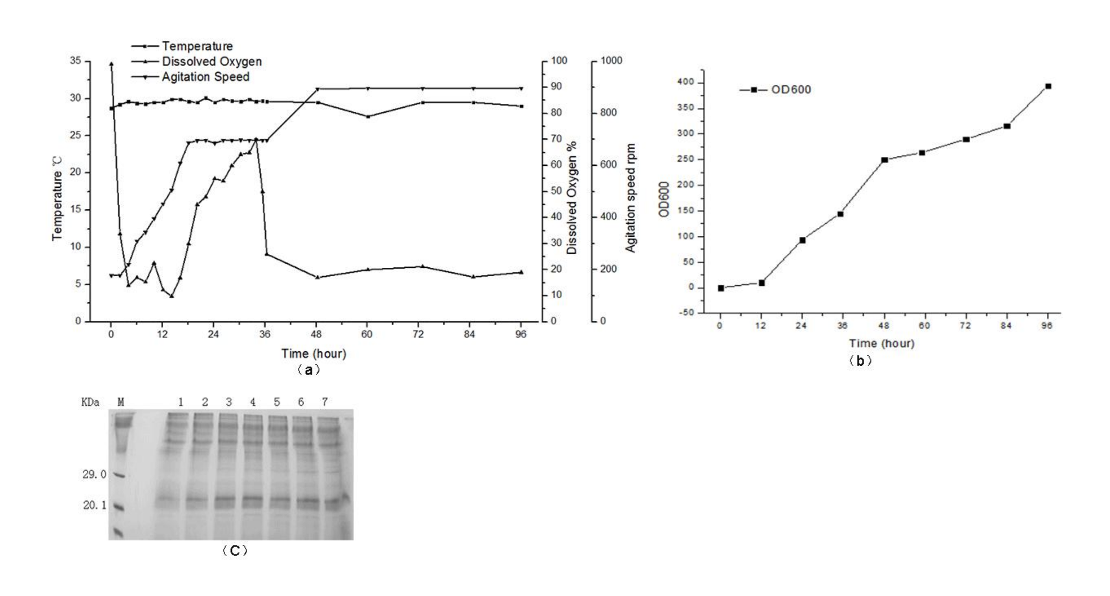


图 4 mRPT(R122H) 10 L 发酵过程记录、生长曲线和 SDS-PAGE 表达鉴定

Fig. 4 The records of fermentation and the SDS-PAGE analysis of the expression of mRPT(R122H)

(a) Time course profile of mRPT(R122H) in an 10 L fermenter; (b) The trend chart of OD_{600} during the fermenter; (c) The SDS-PAGE analysis of the express of mRPT(R122H) M: Protein mark; 1~7: Samples were induced 12、16.5、24、28.7、33、37.5、48h respectively

为了实现重组表达菌株 GS115-mRPT(R122H)的高效表达，采用分批补料发酵。整个高密度发酵过程的调控主要控制溶氧（dissolved oxygen,DO）值的变化，尤其在诱导阶段，甲醇流加速率的增加，DO 值会快速下降，甲醇流加速率的降低，DO 值会迅速上升。而甲醇作为诱导剂的同时，甲醇及其代谢产物对表达宿主具有毒害作用[14]，因此甲醇的流加速率是整个发酵调控的关键因素，整个发酵的过程参数记录见图 4a。在甲醇诱导阶段，分别取不同诱导时间的发酵液，离心收集上清，SDS-PAGE 分析结果见图 4c，目的条带表观分子量为 20.1 KDa，与摇瓶发酵相同。在诱导表达 12 h 后，目的蛋白表达量较低，但随着菌体对甲醇的适应，菌体生长速率加快（图 4b），目的蛋白表达量逐渐增加（图 4c），在诱导 48 h 后，目的蛋白的浓度达到 200 mg/L。

2.2.2 mRPT（R122H)的纯化

收集发酵液上清，对 20 mM HAc-NaAC pH 4.5 透析，用 CM-FF 离子交换层析纯化，SDS-PAGE 电泳结果显示在 20.1 KDa 处得到较纯的目的蛋白（见图 5a），收集目的蛋白，激活得到活性 mRPT(R122H)，并对激活后的 mRPT(R12H)进一步用苯甲脒柱进行亲和纯化，纯化 SDS-PAGE 电泳分析结果显示，纯化后的目的条带均一（见图 5b），苯甲脒柱洗脱曲线见图 5c。

同样方法获得重组胰蛋白酶 RPT 和突变体 mRPT(R122H)、mRPT(R122H/R73G/R130T)，比活分别为 5203.3 USP/mg，4469.1 USP/mg，4962.9 USP/mg。

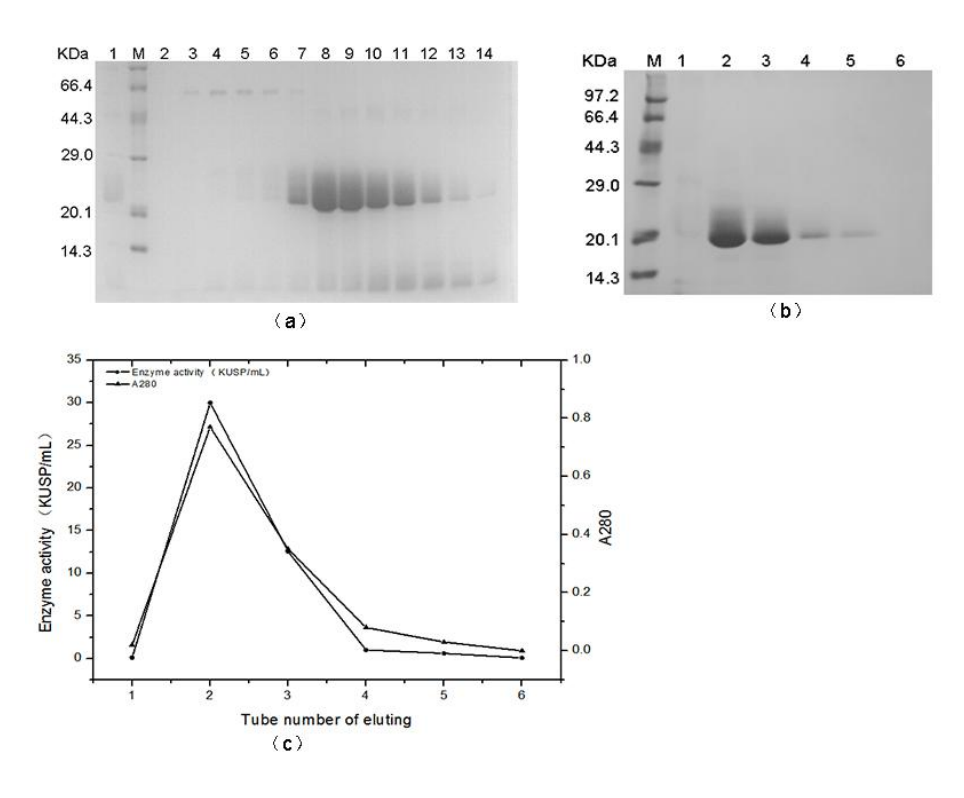


图 5 mRPT(R122H)的纯化

Fig. 5 The purification of mRPT(R122H)

(a) The SDS-PAGE analysis of mRPT(R122H) by CM-FF chromatography

1:The loading sample; M:Protein mark; 2:The flow out part; 3:Balance part; 4-14:Eluting parts; (b) The SDS-PAGE analysis of mRPT(R122H) by Hitrap benzamidine chromatography M:Protein mark; 1~6:Eluting parts (c) Elution curve

2.3 重组胰蛋白酶及其突变体的酶促反应动力学常数

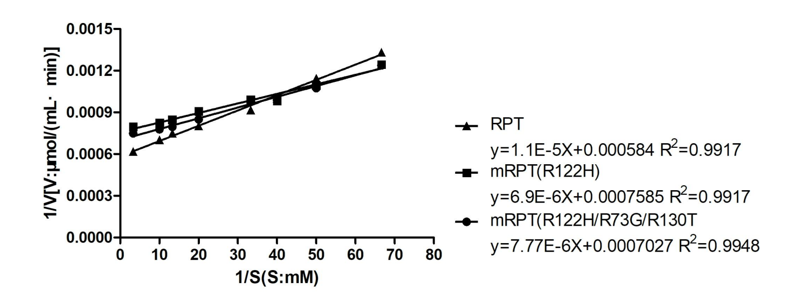


图 6 RPT 和突变体 mRPT(R122H)、mRPT(R122H/R73G/R130T)的 Km 值测定

Fig. 6 Determination of Km of RPT and mutants

表 1 重组猪胰蛋白酶及两突变体的酶促动力学

Table 1 Kinetic Parameters of RPT and mutants mRPT(R122H)、 mRPT(R122H/R73G/R130T)

	Km(μM)	Kcat(min^{-1})	Kcat/Km(min^{-1}/μ M^{-1})	Vmax（μmol/（mL •min）)
RPT	18.8	7027.3	373.8	1712.3
mRPT(R122H)	9.0	6492.9	721.4	1318.4
mRPT(R122H/R73G/R130T)	11.0	7008.5	637.1	1423.1

根据 Lineweaver-Burk 双倒数法作图，结果见图 6，酶学动力学参数结果见表 1。对底物 BAEE 的亲和力，野生型 RPT 的 Km 值为 18.8 μM，突变体 mRPT(R122H)、mRPT(R122H/R73G/R130T)的 Km 值分别为 9.0 μM 和 11.0 μM。突变体表现出对底物 BAEE 更强的亲和力。突变前后的催化效率（Kcat）和 Vmax 均没有明显差别（见表 1），但两突变体的 Kcat/Km 值均显著大于 RPT。从酶学参数的测定结果可知，突变提高了对底物的亲和力和催化效率，其中突变体 mRPT(R122H)表现出的催化效率最高，与之相比，增加了另外两个突变位点反而降低了催化效率。

2.4 重组胰蛋白酶及其突变体的最适 pH 和 pH 稳定性

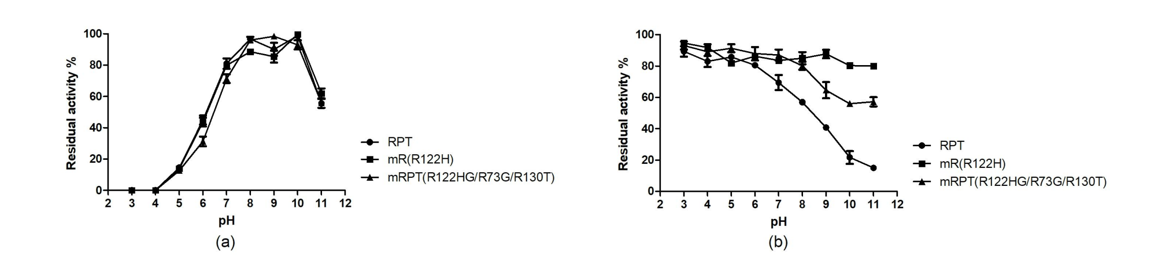


图 7 RPT 和突变体 mRPT(R122H)、 mRPT(R122H/R73G/R130T)的最适 pH 和 pH 稳定性

Fig. 7 Optimal pH (a) and Effect of pH on the stability (b) of RPT and mutants

以 BAEE 为底物，测定 RPT 和其突变体的最适 pH，结果见图 7a，突变位点对胰蛋白酶的最适 pH 范围没有影响，最适 pH 均在 pH 8.0-10.0，相对于胰蛋白酶典型的两个最适 pH 的“M”型曲线，三突变表现出典型的钟形曲线，最适 pH 9.0。

不同 pH 条件下的稳定性（结果见图 7b），突变体表现出较好的稳定性。在 pH 3.0~6.0 酸性条件下，突变前后的稳定性无明显差异，酶活残余率均能保持在 80 %以上。随着 pH 升高，三者酶活残余率均呈现明显下降趋势，但可观察到突变体对碱的耐受能力相对于野生型 RPT 有明显的提高。在强碱 pH 11.0 条件下，RPT 酶活残余为初始酶活 14 %，突变体 mRPT（R122H）和突变体 mRPT(R122H/R73G/R130)的酶活残余率分别达到 80 %，55 %。表明突变提高了 RPT 在碱性条件的耐受能力，其中突变体 mRPT（R122H）耐碱能力最优。

2.5 重组胰蛋白酶及其突变体的最适温度和温度稳定性

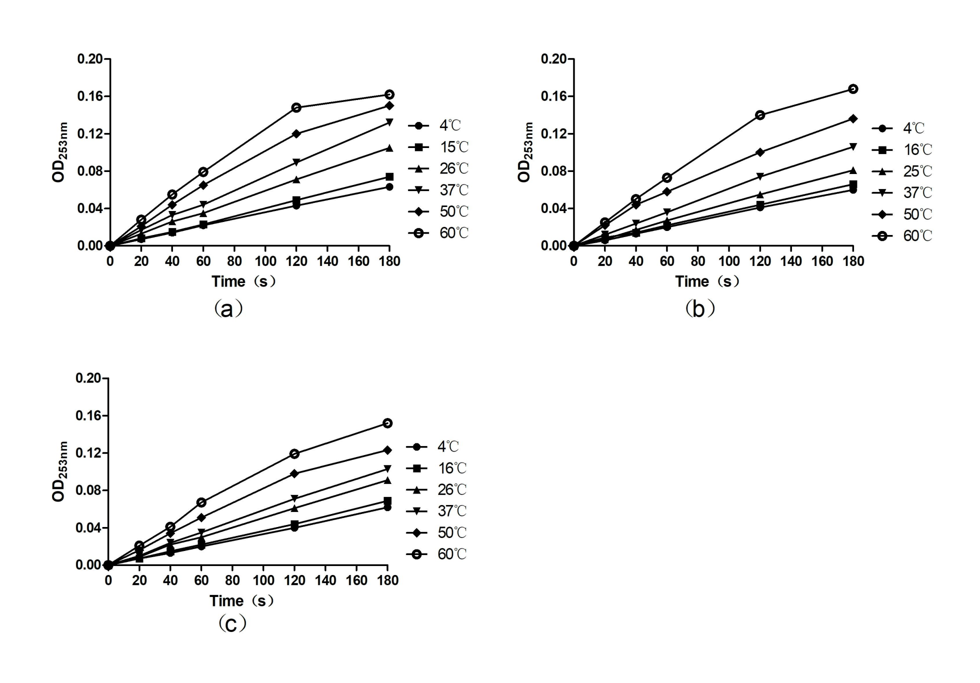


图 8 重组猪胰蛋白酶和突变体 mRPT(R122H)、mRPT(R122H/R73G/R130T)的最适温度

Fig. 8 Optimal temperature ofRPT(a) , mRPT(R122H)(b) and mRPT(R122H/R73G/R130T)(c)

RPT 和两突变体的最适温度结果见图 8，野生型 RPT 酶活大小随着温度上升而增强，但在 37 ℃以上时，酶活的增长在 3 min 中的线性相关系数 R^2 值逐渐降低，因此 37 ℃为 RPT 最适温度，突变体最适温度一致。突变体对高温耐受能力增强（见图 9）。在 4 ℃至 25 ℃温育 16 h，RPT 和两突变体均很稳定；在 37 ℃和 50 ℃条件温育 16 h 后，两突变体酶活残余率保持 80 %以上，而野生型则为 70 %。在 60 ℃保温 16 h，RPT，突变体 mRPT(R122H)和突变体 mRPT(R122H/R73G/R130T)的酶活残余率分别为 54 %，66 % 和 60 %。总体表明，突变体的热稳定性得到相应的提升，突变体 mRPT(R122H)在高温下表现出更好的酶活稳定性。

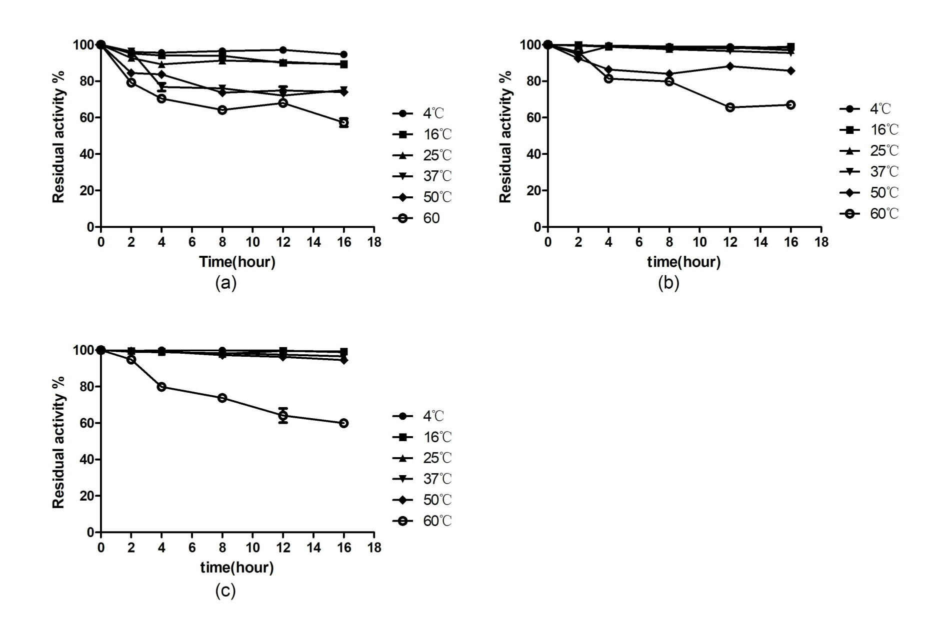


图 9 RPT 和突变体 mRPT(R122H)、 mRPT(R122H/R73G/R130T)的温度稳定性

Fig. 9 Thermal stability of RPT(a) , mRPT(R122H)(b) and mRPT(R122H/R73G/R130T)(c)

2.6 胰蛋白酶及其突变体的自降解分析

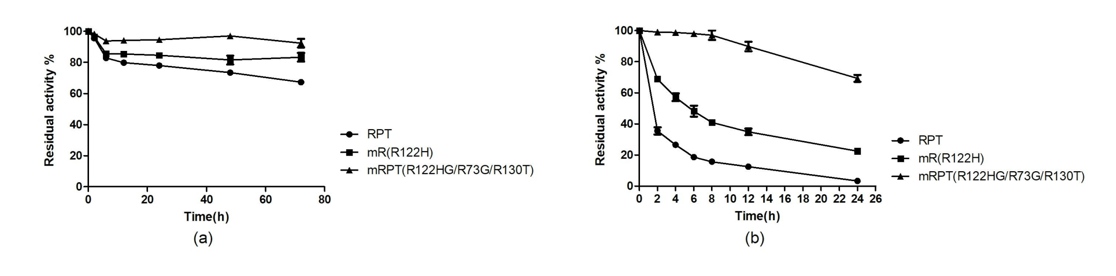


图 10 RPT 和突变体自降解活性测定

Fig. 10 Time course of the decrease of activity of RPT and mutants in the presence of 20 mM Ca^{2+} (a) And 1mM EDTA (b)

为了研究突变位点对胰蛋白酶稳定性的贡献，对比研究了在 Ca^{2+} 存在及用 EDTA 络合去除 Ca^{2+} 后的稳定性，结果见图 10。Ca^{2+}对胰蛋白酶的稳定性起到重要的作用，极大增强了胰蛋白酶的稳定性。在 20 mM Ca^{2+}存在下，25 ℃温育 72 h，RPT, mRPT(R122H)和 mRPT(R122H/R73G/R130)的酶活残余率分别为为 65 %、85 %和 90 %。而在 1 mM EDTA 条件下，温育 24 h 后，RPT 的酶活仅存

3 %，mRPT(R122H) 为 25 %，而 mRPT(R122H/R73G/R130)则保持在 68 %，表现出极大改善的稳定性。分析其原因，Ca^{2+}不仅是胰蛋白酶活性所必须，一定浓度的 Ca^{2+}也是其稳定性必须的，主要是因为 Ca^{2+}作为一个阳离子，与自降解位点如精氨酸和赖氨酸残基起到的屏障保护作用，但在 1mM EDTA 不影响胰蛋白酶活性条件下[15]，EDTA 络合胰蛋白酶本身的 Ca^{2+}，除去 Ca^{2+}对胰蛋白酶的保护作用，使得胰蛋白酶的稳定性显著性降低。

RP-HPLC 对降解前后的分析证实了突变位点对其自降解的保护作用（图 11）。

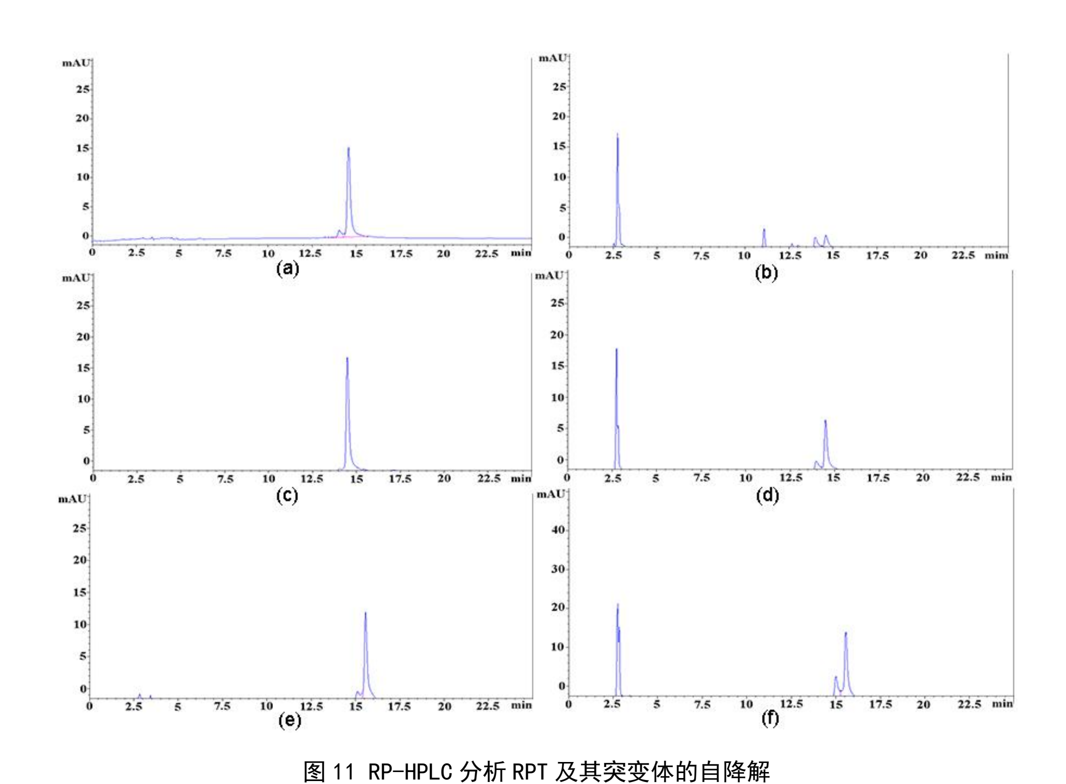


图 11 RP-HPLC 分析 RPT 及其突变体的自降解

Fig. 11 RP-HPLC analysis on self-digestion of RPT and mutants at pH 8.0, 1mM EDTA, 25℃.

(a) and (b)RPT incubated for 0h and 1h; (c) and (d) mRPT(R122H) incubated for 0h and 1h;(e) and (f) mRPT(R122H/R73G/R130T) incubated for 0h and 1h.

发现 RPT 在 pH 8.0 缓冲液中 25 ℃温育 1 h 完全降解，而突变体的稳定性得到提高，表现为未降解峰的保留增加。根据 USP 对重组胰蛋白酶 RP-HPLC 的峰指认，重组胰蛋白酶样品主峰的保留时间是 12-17 min，其中α-胰蛋白酶与β-胰蛋白酶主峰之间的距离不小于 1 min。RPT 温育 1 h 后，由保留时间为 14.582 min，14.060 min 的主峰降解形成一个 6 种不同极性的肽段如图 11b 所示，保留

时间依次为 2.7 min，11.0 min，12.6 min，13.0 min，14.0 min 和 14.6 min。α-胰蛋白酶、β-胰蛋白酶的总峰面积和降解肽段峰面积比率分别为38.2%、61.8 %。突变体的降解肽段数明显减小如图 11（d，f），降解程度明显降低。由分析结果可知突变体 mRPT(R122H)温育 1 h 后，α-胰蛋白酶和β-胰蛋白酶总峰面积和降解肽段峰面积分别为 54.5 %和 45.4 %；突变体 mRPT(R122H/R73G/R130T)分别为 31.7 %、68.2 %。结果表明特异位点突变极大提高了 RPT 的抗自降解能力，其中突变体 mRPT(R122H/R73G/R130T)表现最优。这一结果与活性的测定结果相一致（图 10 所示），证明了活性的降低是由于自降解所致。

3 讨论

胰蛋白酶为重要的三种消化酶（糜蛋白酶、胃蛋白酶）之一，相对于另外两种消化酶，胰蛋白酶具有更强的特异性识别能力，可特异性识别并切割肽链的 K 和 R 羧基端。而胰蛋白酶本身存在多个易识别位点，导致胰蛋白酶具有自催化活性。目前，纯化和鉴定出的胰蛋白酶自溶片段具有α，ψ，σ，γ，ε 和δ六种，这些自催化产生的亚型对胰蛋白酶的活性具有不同程度的影响[16]，猪胰蛋白酶产生的α-胰蛋白酶（K145-S146 ）的酶催化活性只有β-胰蛋白酶的 80%，由自催化活性产生的片段会结合到胰蛋白酶的活性位点，降低胰蛋白酶的催化能力[17]。

人源、猪源、鼠源和牛源胰蛋白酶具有高度的同源性。据报道，小鼠胰蛋白酶位于 K66 和 R122 之间的 57 个氨基残基组成的肽段由于没有二硫键的保护，极易导致小鼠胰蛋白酶发生自降解[13]。鼠胰蛋白酶和猪胰蛋白酶氨基序列比对发现二者的同源性达到 78%，三维结构上具有高度的相似性（图 1），具有相同的 K66 和 R122 位自降解位点。从猪胰蛋白酶的三维结构分析可知，K66 和 R122 位之间的肽段主要为位于胰蛋白酶的分子表面的无规则卷曲，这导致该位点极易被自身识别而发生降解。其中在人胰蛋白酶中，R122 的突变也是遗传性胰腺炎的主要病因。

本研究主要通过对猪胰蛋白酶 R73、R122 和 R130 位进行残基替换，构建了突变体 mRPT(R122H)和突变体 mRPT(R122H/R73G/R130T)，利用毕赤酵母

GS115 实现猪胰蛋白酶原的分泌表达。通过对突变体和野生型稳定性的对比，发现定向改造之后，两突变体不仅在酶活催化效率上得到相应的提升，同时耐碱和耐高温能力均得到提高。RP-HPLC 对其自催化产生的自降解片段的分析也表明了，位点突变显著降低了猪胰蛋白酶的自降解。这一结果对于改进胰蛋白酶的稳定性提供了实验依据。

致谢 感谢华东理工大学生物反应器工程重点实验室对本研究提供的基金支持。

参 考 文 献

[1] Robert W. Olafson, Lubomir Jurasek, Michael R. Carpenter, et al. Amino acid sequence of Streptomyces griseus trypsin. Cyanogen bromide fragments and complete sequence[J]. Biochemistry. 1975, 14(6):1168-1177.

[2] Lombardi J, Valetti N W, Picó G et al. Obtainment of a highly concentrated pancreatic serine proteases extract from bovine pancreas by precipitation with polyacrylate[J]. Separation & Purification Technology, 2013,116(37):170-174.

[3] Zhang Y, Ling Z, Du G, et al. Improved Production of Active Streptomyces griseus Trypsin with a Novel Auto-Catalyzed Strategy[J]. Sci Rep, 2016, 6:23158.

[4] 杜坤, 甘一如, 黄鹤. 活性位点邻近的Ω-loop 对胰蛋白酶热稳定性和活性的影响[J]. 高校化学工程学报, 2017, 31(3):657-662.

DU K, GAN Y R, HUANG H.Effects of Near Active Sites on the Stability and Activity of Trypsin[J].Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities,2017, 31(3):657-662.

[5] Cao Y, Wen L, Svec F, et al. Magnetic AuNP@Fe 3 O 4, nanoparticles as reusable carriers for reversible enzyme immobilization[J]. Chemical Engineering Journal, 2016, 286(15):272-281.

[6] Liu Y, Zhang W, Yang X, et al. DsbA-DsbAmut fusion chaperon improved soluble expression of human trypsinogen-1 in Escherichia coli[J]. Frontiers of Chemical Science & Engineering, 2015, 9(4):511-521.

[7] Shu M, Shen W, Wang X, et al. Expression, activation and characterization of porcine trypsin in Pichia pastoris GS115.[J]. Protein Expression & Purification, 2015, 114(16):149-155.

[8] Olsen J V, Ong S E, Mann M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues.[J]. Molecular & Cellular Proteomics Mcp, 2004, 3(6):608-614.

[9] Maroux S, Desnuelle P. On some autolyzed derivatives of bovine trypsin[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 1969, 181(1):59-72.

[10] Raphael K L, Willingham F F. Hereditary pancreatitis: current perspectives:[J]. Clinical & Experimental Gastroenterology, 2016, 9(Issue 1):197-207.

[11] DC Whitcomb, MC Gorry, RA Preston, et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene.[J]. Nature genetics, 1996, 14(2):141-5.

[12] 马强, 吴倩, 李素霞. R122L 突变提高重组人阴离子型胰蛋白酶的稳定性的研究[J]. 中国生化药物杂志, 2014, 34(2):61-64+67.

MA Q，WU Q，LI S X.The research of site R 122 L mutate improve the stability of recombinant human anionic trypsin[J].Chinese Journal of Biochemical and Pharmaceutics,2014, 34(2):17.

[13] Várallyay E, Pál G, Patthy A, et al. Two mutations in rat trypsin confer resistance against autolysis[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 1998, 243(1):56-60.

[14] 张震阳, 杨艳坤, 等. Pichia pastoris X-33 △GT2 缓解甘油对 AOX1 的阻遏并用于外源蛋白的高效表达[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(1):38-45.

ZHANG Zhen-yang，YANG Yan-kun ect.Pichia pastoris X-33 ΔGT2 release the Glycerol Ｒepression on AOX1and Ef-ficiently Express Heterologous Proteins[J].China Biotechnology,2017,37(1):38-45.

[15] 王琨. 南极磷虾胰蛋白酶的分离纯化及酶学性质研究[D]. 大连理工大学, 2013.

WANG K.Purification and characterization of the trypsin from Euphausia superba[D].Daliall University of Technology,2013.

[16] Huang Q, Wang Z, Li Y, et al. Refined 1.8 A resolution crystal structure of the porcine epsilon-trypsin[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 1994, 1209(1):77-82.

[17] Syedibrahim B, Shamaladevi N, VasanthaPattabhi. Trypsin Activity Reduced by an Autocatalytically Produced Nonapeptide[J]. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2004, 21(6):737-744.